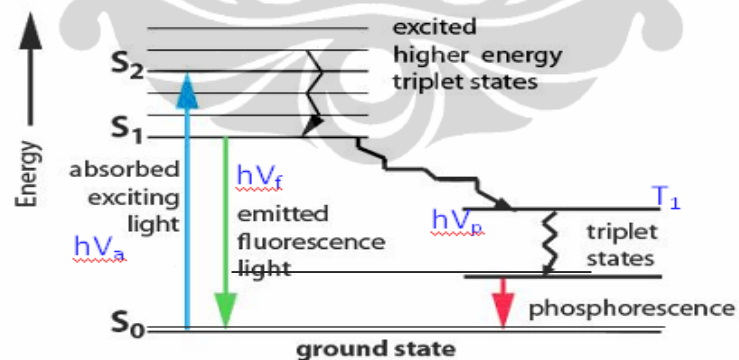


## BAB 2 LANDASAN TEORI

### 2.1 Prinsip Fluoresensi

Fluoresensi adalah proses pemancaran radiasi cahaya oleh suatu materi setelah tereksitasi oleh berkas cahaya berenergi tinggi. Emisi cahaya terjadi karena proses absorpsi cahaya oleh atom yang mengakibatkan keadaan atom tereksitasi. Keadaan atom yang tereksitasi akan kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi yang berupa cahaya (de-eksitasi). Fluoresensi merupakan proses perpindahan tingkat energi dari keadaan atom tereksitasi ( $S_1$  atau  $S_2$ ) menuju ke keadaan stabil (*ground states*). Proses fluoresensi berlangsung kurang lebih 1 nano detik sedangkan proses fosforesensi berlangsung lebih lama, sekitar 1 sampai dengan 1000 mili detik.

Gambar 2.1 adalah gambar diagram Jablonski yang menunjukkan terjadinya proses fluoresensi dan fosforesensi. Ketika suatu atom atau molekul mengabsorpsi energi cahaya sebesar  $h\nu_A$  maka elektron-elektron pada kondisi dasar (*ground state*)  $S_0$  akan berpindah ke tingkat energi yang lebih tinggi ke tingkat  $S_1$  atau  $S_2$ . Waktu yang dibutuhkan untuk proses tersebut kurang dari 1 piko detik.

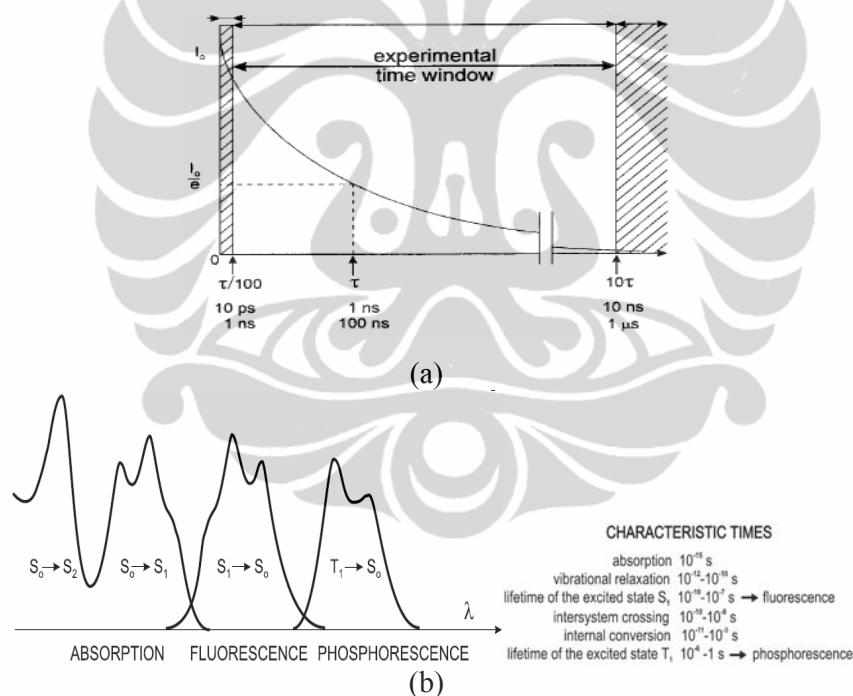


Gambar 2.1. Proses fluoresensi dan fosforesensi [14].

Atom akan mengalami konversi internal atau relaksasi pada kondisi  $S_1$  dalam waktu yang sangat singkat sekitar  $10^{-1}$  ns, kemudian atom tersebut akan melepaskan sejumlah energi sebesar  $h\nu_f$  yang berupa cahaya. Karenanya energi atom semakin lama semakin berkurang dan akan kembali menuju ke tingkat

energi dasar  $S_0$  untuk mencapai keadaan suhu yang setimbang (*thermally equilibrium*). Emisi fluoresensi dalam bentuk spektrum yang lebar terjadi akibat perpindahan tingkat energi  $S_1$  menuju ke sub-tingkat energi  $S_0$  yang berbeda-beda yang menunjukkan tingkat keadaan energi dasar vibrasi atom 0, 1, dan 2 berdasarkan prinsip Frank-Condon [14].

Apabila *intersystem crossing* terjadi sebelum transisi dari  $S_1$  ke  $S_0$  yaitu saat di  $S_1$  terjadi konversi spin ke *triplet state* yang pertama ( $T_1$ ), maka transisi dari  $T_1$  ke  $S_0$  akan mengakibatkan fosforesensi dengan energi emisi cahaya sebesar  $h\nu_p$  dalam selang waktu kurang lebih  $1\mu s$  sampai dengan  $1s$ . Proses ini menghasilkan energi emisi cahaya yang relatif lebih rendah dengan panjang gelombang yang lebih panjang dibandingkan dengan fluoresensi (Gambar 2.2.a-b).



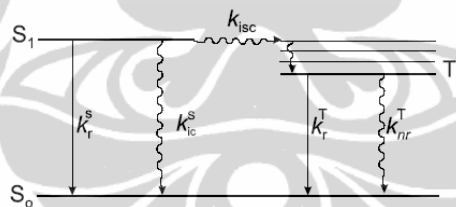
Gambar 2.2. (a) Diagram *lifetime* fluoresensi dan fosforesensi [14].  
(b) Spektrum fluoresensi dengan fosforesensi [14].

Beberapa kondisi fisis yang mempengaruhi fluoresensi pada molekul antara lain polaritas, ion-ion, potensial listrik, suhu, tekanan, derajat keasaman (pH), jenis ikatan hidrogen, viskositas dan *quencher* (penghambat de-eksitasi). Kondisi-kondisi fisis tersebut mempengaruhi proses absorpsi energi cahaya eksitasi. Hal ini berpengaruh pada proses de-eksitasi molekul sehingga

menghasilkan karakteristik intensitas dan spektrum emisi fluoresensi yang berbeda-beda [14-15].

## 2.2 Parameter Fluoresensi

Intensitas fluoresensi adalah jumlah foton yang diemisikan per unit waktu (s) per unit volume larutan (l) dalam mol atau ekuivalensinya dalam Einstein, dimana 1 Einstein = 1 foton mol. Intensitas fluoresensi dalam unit volume larutan (medium) yang tereksitasi terjadi dalam selang waktu transisi (*lifetime*). Intensitas fluoresensi tersebut merupakan hasil emisi de-eksitasi sehingga *lifetime* pada  $S_1$  akan berpengaruh terhadap besarnya intensitas fluoresensi. Pada gambar 2.3,  $k_r^S$  adalah konstanta kecepatan radiasi  $S_1 \rightarrow S_0$  (transisi dari  $S_1$  ke  $S_0$ ),  $k_{nr}^T$  adalah konstanta kecepatan non radiasi  $T_1 \rightarrow S_0$  (transisi dari  $T_1$  ke  $S_0$ ) yang terjadi setelah proses *internal crossing system*  $S_1 \rightarrow T_1$ ,  $k_{ic}^S$  adalah konstanta kecepatan proses *internal conversion* (bersifat non radiatif) dari  $S_1 \rightarrow S_0$  yang terjadi setelah transisi  $S_2 \rightarrow S_1$ , dan  $k_r^T$  adalah konstanta kecepatan radiatif transisi  $T_1 \rightarrow S_0$  yang terjadi setelah proses *internal crossing system*  $S_1 \rightarrow T_1$ .



Gambar 2.3. Diagram *lifetimes* proses transisi energi.

Eksitasi hingga ke tingkat energi  $S_1$  terjadi apabila sejumlah molekul  $A$  menyerap energi cahaya, dan ketika kembali ke tingkat energi  $S_0$  molekul tersebut akan mengemisikan radiasi atau melepaskan energi non radiasi (fonon atau energi panas) dengan laju eksitasi sebagai berikut:

$$-\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S)[{}^1A^*] \dots \dots \dots (2.1)$$

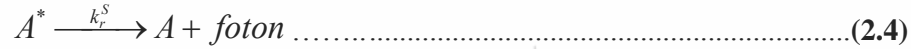
Dengan  $A^*$  adalah molekul  $A$  yang tereksitasi. Jumlah konsentrasi molekul yang tereksitasi dalam waktu  $t$  detik diperoleh dengan mengintegrasikan persamaan 2.1 terhadap waktu  $t$  sebagai berikut:

$$[{}^1A^*] = [{}^1A] \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \dots\dots\dots (2.2)$$

$\tau_S$  adalah *lifetime* pada  $A^*$  di  $S_1$ , yang didefinisikan sebagai:

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \dots\dots\dots (2.3)$$

Molekul  $A^*$  mengemisikan foton akibat laju konstanta radiasi  $k_r$ , yaitu:



Respon intensitas fluoresensi  $i_F(t)$  merupakan intensitas yang mengalami penurunan secara eksponensial saat molekul  $A$  dieksitasi oleh pulsa cahaya  $\delta(t)$ :

$$i_F(t) = k_r^S [{}^1A^*] = k_r^S [{}^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \dots\dots\dots (2.5)$$

Laju konstanta radiasi dan non-radiasi berpengaruh terhadap intensitas fluoresensi sehingga hubungan antara kedua konstanta tersebut dapat dinyatakan sebagai efisiensi kuantum fluoresensi  $\Phi_F$  (lihat persamaan 2.3 dan 2.4). Dengan kata lain, rasio antara jumlah foton yang diemisikan dan jumlah foton yang diserap dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_S \dots\dots\dots (2.6)$$

$$\Phi_F = \frac{\tau_S}{\tau_r} \dots\dots\dots (2.7)$$

Dalam kondisi tunak perubahan laju molekul yang tereksitasi bernilai konstan sehingga persamaan 2.1 menjadi:

$$-\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r^S + k_{nr}^S) [{}^1A^*] \dots\dots\dots (2.8)$$

Dimana  $k_a \alpha N_0$  adalah jumlah foton yang diserap per unit volume (L) per satuan detik (s). Karena jumlah molekul adalah konstan, sehingga intensitas fluoresensi dalam kondisi tunak adalah:

$$i_F = k_r^S [{}^1A^*] = \alpha I_0 \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = \alpha I_0 \Phi_F \dots\dots\dots (2.9)$$

Intensitas fluoresensi dalam kondisi tunak per jumlah foton yang diserap sebagai fungsi panjang gelombang foton yang diemisikan dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$\int_0^{\infty} F_{\lambda}(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F \dots\dots\dots (2.10)$$

atau

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k F_{\lambda}(\lambda_F) I_A(\lambda_E) \dots\dots\dots (2.11)$$

Dengan mensubstitusikan persamaan 2.10 ke persamaan 2.11 diperoleh:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = k \Phi_F I_A(\lambda_E) \dots\dots\dots (2.12)$$

dimana

$$I_A(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) - I_T(\lambda_E) \dots\dots\dots (2.13)$$

dengan:

$I_F(\lambda_F)$  = intensitas fluoresensi yang diukur pada rentang spektrum panjang gelombang fluoresensi  $\lambda_F$ .

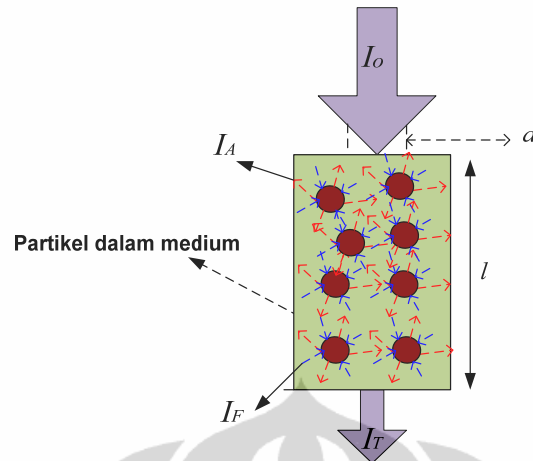
$I_A(\lambda_E)$  = selisih intensitas cahaya yang datang dengan intensitas yang ditransmisikan pada gelombang  $\lambda_E$ .

$I_T(\lambda_E)$  = intensitas eksitasi ditransmisikan.

$I_0(\lambda_E)$  = intensitas cahaya yang datang.

$k$  = konstanta fluoresensi, yang besarnya tergantung pada setup optis antara detektor dengan berkas fluoresensi.

Proses fluoresensi dapat terjadi pada partikel dalam suatu medium. Hal tersebut terjadi akibat respon terhadap cahaya eksitasi dari elemen-elemen penyusunnya (kumpulan-kumpulan molekul atau atom yang relatif homogen) dengan mengasumsikan bahwa dimensi partikel sangat tipis sehingga proses absorpsi terhadap cahaya eksitasi tidak mengalami hambatan atau gangguan [14-16]. Pada saat cahaya eksitasi  $I_0$  datang menuju medium (dimensi  $l \times l$ ) yang berisi partikel-partikel, cahaya tersebut akan diabsorpsi oleh partikel-partikel sebesar  $I_A$  dan sebagian diteruskan (tanpa absorpsi) sebesar  $I_T$  (persamaan 2.13). Cahaya yang diabsorpsi selanjutnya dikonversi menjadi emisi cahaya fluoresensi ( $I_F$ ) oleh faktor efisiensi kuantum  $\Phi_F$  (persamaan 2.12).



Gambar 2.4. Proses fluoresensi pada partikel dalam medium.

Hubungan antara intensitas fluoresensi dan absorbansi suatu partikel akibat eksitasi dari suatu sumber cahaya dinyatakan dengan menggunakan hukum *Beer-Lambert*. Intensitas cahaya eksitasi yang ditransmisikan oleh sejumlah konsentrasi partikel  $N$  sebesar  $I_T(\lambda_E)$  pada luasan medium  $a$  dan sepanjang arah rambat cahaya eksitasi  $l$  dituliskan sebagai berikut [17]:

$$I_T = I_0(\lambda_E) \left( \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l] \right) \dots \dots \dots (2.14)$$

dimana

$\varepsilon(\lambda_E)$  = koefisien absorpsi pada panjang gelombang eksitasi (L/[partikel.m])

$l$  = panjang lintasan optik yang dilewati oleh sumber cahaya (m)

$N$  = konsentrasi partikel (partikel/L)

$a$  = luasan berkas cahaya eksitasi yang melewati partikel-partikel dalam medium ( $m^2$ )

Tanda minus dalam eksponensial pada persamaan 2.1.4 menunjukkan bahwa intensitas cahaya eksitasi yang ditransmisikan oleh konsentrasi partikel menurun secara eksponensial akibat luasan berkas sinar eksitasi  $a$  dan absorpsi sepanjang lintasan  $l$ . Dengan mensubstitusikan persamaan 2.14 ke 2.13 didapatkan persamaan intensitas absorpsi cahaya eksitasi pada konsentrasi partikel, sebesar:

$$I_A = I_0(\lambda_E) (1 - \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l]) \dots \dots \dots (2.15)$$

Intensitas cahaya fluoresensi yang diemisikan oleh suatu konsentrasi partikel pada suatu volume, adalah sebanding dengan jumlah intensitas cahaya absorpsi yang terkonversi menjadi cahaya fluoresensi (persamaan 12). Selanjutnya

dengan mensubstitusikan persamaan 2.15 ke 2.12 diperoleh intensitas cahaya fluoresensi sebagai fungsi  $\Phi_F$  yaitu:

$$I_F = k\Phi_F I_0(\lambda_E)(1 - \exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l]) \dots\dots\dots(2.16)$$

Persamaan 2.16 merupakan fungsi  $I_F$  yang membentuk hubungan eksponensial sebagai fungsi dari  $I_A$  dan  $I_T$ .  $\Phi_F$  merupakan faktor konversi intensitas cahaya yang diabsorpsi oleh konsentrasi partikel menjadi energi cahaya fluoresensi dan diperoleh melalui pendekatan empirik (eksperimen) dan analitik mengacu pada persamaan 2.7 dan 2.10. Faktor  $\Phi_F$  tergantung dari karakteristik absorpsi dan fluoresensi partikel dalam medium.

Persamaan 2.16 dapat disederhanakan dengan menggunakan deret *Mc Laurin* menjadi sebagai berikut:

$$\exp[-Na\varepsilon(\lambda_E)l] = [1 - Na\varepsilon(\lambda_E)l] \dots\dots\dots(2.17)$$

Persamaan 2.17 kemudian disubstitusikan ke persamaan 2.16 diperoleh bentuk persamaan yang lebih sederhana, yaitu :

$$I_F = k\Phi_F I_0(\lambda_E)[Na\varepsilon(\lambda_E)l] \dots\dots\dots(2.18)$$

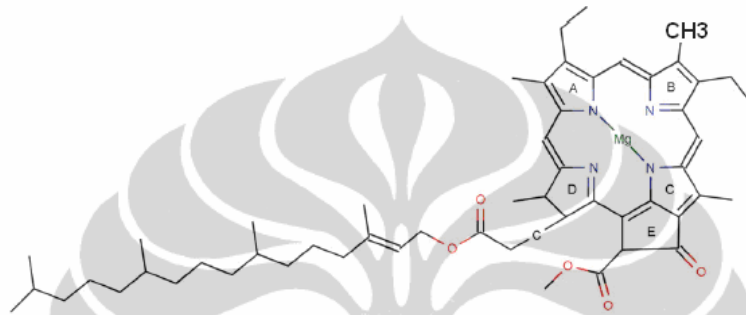
Perbandingan antara  $I_F$  dan  $I_0$  pada persamaan 2.18 dinyatakan dalam persamaan 2.19 dan disebut sebagai intensitas fluoresensi yang ternormalisasi.

$$\frac{I_F}{I_0} = k\Phi_F Na\varepsilon(\lambda_E)l \dots\dots\dots(2.19)$$

### 2.3 Fluoresensi Pada Fitoplankton

Fitoplankton memiliki berbagai pigmen, diantaranya klorofil, karotenoid, dan ficobiliprotein, yang berupa molekul-molekul organik yang terdiri dari ikatan karbon-hidrogen [4]. Ketiga pigmen inilah yang dapat menyebabkan proses fluoresensi. Keberadaan dan komposisi (kandungan) dari ketiga jenis pigmen tersebut selain berperan memberikan ciri khas pewarnaan pada setiap fitoplankton juga memiliki fungsi biologis yang unik dan khas terkait dengan fungsi metabolisme dan fisiologis. Secara fisis dengan adanya pigmen tersebut akan terjadi interaksi dengan cahaya, yaitu proses absorpsi energi cahaya dalam proses fotosintesis.

Penyerapan cahaya eksitasi oleh molekul-molekul penyusun pigmen mengakibatkan tingkat energi molekul tersebut meningkat dari keadaan dasar menjadi keadaan tereksitasi (proses fluoresensi). Saat kondisi tereksitasi molekul-molekul pigmen mengalami relaksasi dalam waktu yang singkat dan selanjutnya kembali ke tingkat energi dasar semula dengan melepaskan radiasi energi cahaya fluoresensi.



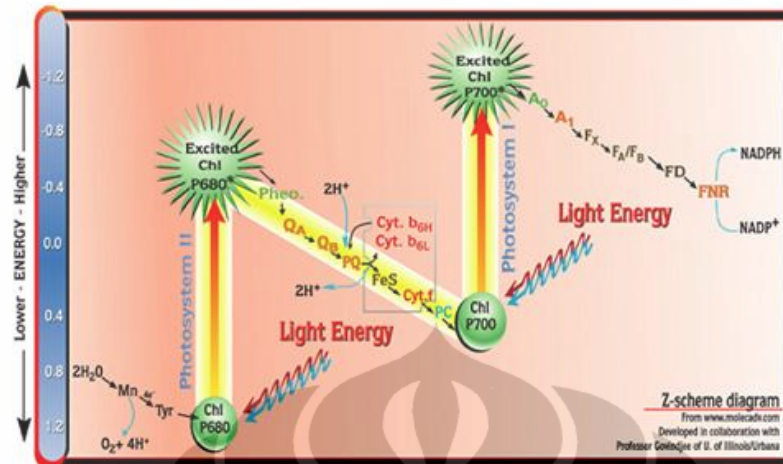
Gambar 2.5. Struktur molekul klorofil-a [18].

Semua ordo fitoplankton umumnya memiliki klorofil-a pada sel fitoplankton. Struktur molekul klorofil-a ditunjukkan pada gambar 2.5. Klorofil-a pada jenis fitoplankton *Scenedesmus* sp. yang memiliki ukuran sel sekitar 2,5 – 12  $\mu\text{m}$  akan tampak kehijauan seutuhnya seperti ditunjukkan pada gambar 2.6. Pada klorofil-a juga berlangsung proses fotosintesis, yang menghasilkan makanan, energi serta oksigen dari proses fiksasi karbondioksida dengan bantuan energi cahaya seperti ditunjukkan dalam skema-Z pada Gambar 2.7. Model skema-Z menjelaskan proses fotosintesis di klorofil-a yang terjadi secara alamiah pada fitoplankton, dimana akibat penyinaran cahaya matahari akan menimbulkan proses eksitasi.



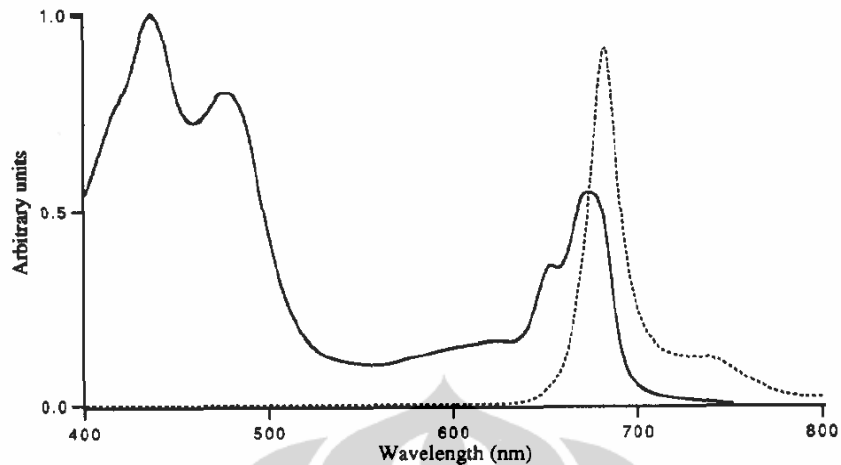
Gambar 2.6. Kultur.





Gambar 2.7. Proses fotosintesis berdasarkan skema-Z [19].

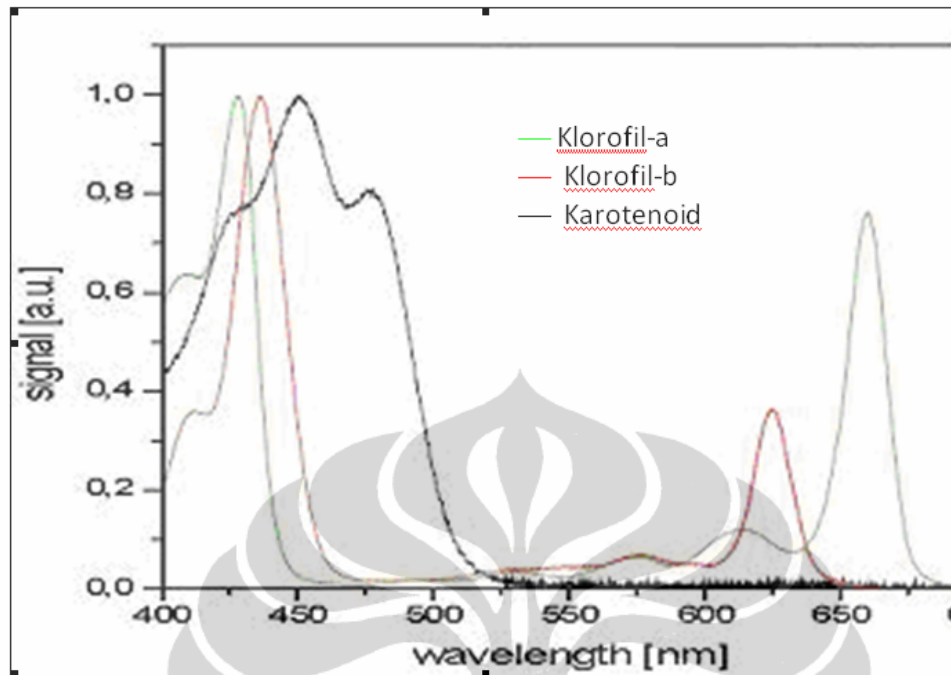
Proses fotosintesis terjadi secara terpisah pada unit-unit kerja fotosintesis (*PSU/Photosynthetic Unit*) [15-16] yaitu *PSU-I* dan *PSU-II* yang dibedakan berdasarkan tingkat absorpsi maksimal terhadap intensitas cahaya pada panjang gelombang tertentu. *PSU-II* secara dominan menyerap intensitas pada panjang gelombang 680 nm sedangkan *PSU-I* pada panjang gelombang 700 nm. Absorpsi tersebut mengakibatkan klorofil-a mengalami eksitasi yang selanjutnya berfluoresensi. Gambar 2.8 menunjukkan karakteristik spektrum fluoresensi yang dihasilkan akibat eksitasi secara alamiah dengan sinar matahari. Rentang absorpsi pada fitoplankton dari 400 hingga 750 nm (garis tebal) menghasilkan emisi spektrum fluoresensi sebesar 625 nm sampai dengan 800 nm (digambarkan dengan garis putus-putus). Daerah absorpsi tersebut merupakan spektrum cahaya yang dibutuhkan oleh klorofil untuk berfotosintesis dan disebut sebagai *Photosynthetically Active Region (PAR)*, dengan kata lain emisi fluoresensi terjadi secara alamiah sebagai akibat adanya proses fotosintesis.



Gambar 2.8. Spektrum absorpsi (garis tebal) dan emisi fluoresensi klorofil-a (garis putus-putus) pada fitoplankton (*Chlamydomonas* sp.) [20].

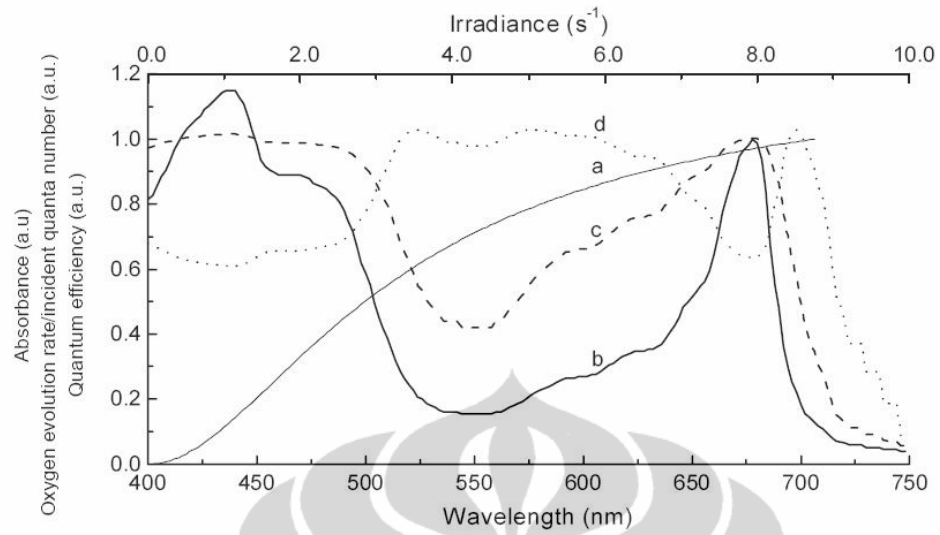
Berbagai penelitian berhasil mengidentifikasi dan mengkarakterisasi spektrum emisi fluoresensi dari berbagai jenis fitoplankton. Penelitian tersebut dilakukan dengan metode *in-vitro* maupun *in-vivo* untuk mengukur karakteristik spektrum fluoresensi. Hasil pengukuran emisi spektrum fluoresensi dari jenis-jenis pigmen menunjukkan bahwa fitoplankton memiliki karakteristik spektrum yang khas. Karakteristik spektrum tersebut memiliki arti penting dalam pengidentifikasian dan penggolongan jenis fitoplankton, karena spektrum tersebut tidak dihasilkan oleh partikel atau bahan lainnya [20].

Perbedaan karakteristik spektrum fluoresensi untuk jenis klorofil-a, klorofil-b, dan karotenoid terletak pada puncak-puncak emisinya yang terjadi pada rentang 400 – 500 nm dan 600 – 700 nm (Gambar 2.9).



Gambar 2.9. Perbedaan spektrum fluoresensi dari klorofil-a, klorofil-b dan karotenoid pada fitoplankton [21].

Intensitas fluoresensi tertinggi (maksimal) pada klorofil-a terjadi pada rentang 400 – 450 nm dan 550 – 700 nm, pada klorofil-b pada rentang 400 – 475 nm dan 600 – 650 nm, dan pada karotenoid pada rentang 400 – 515 nm. Harga intensitas fluoresensi dari klorofil-a pada fitoplankton diperoleh dengan menerapkan persamaan 2.19 melalui pendekatan yang spesifik dan mengacu pada karakteristik fluoresensinya [17-18]. Dari persamaan tersebut, harga  $\Phi_F$  didapatkan melalui pendekatan eksperimental yaitu melalui karakterisasi emisi fluoresensi saat merespon sumber cahaya eksitasi pada panjang gelombang tertentu. Dalam penelitian ini, hasil penelitian yang telah dilakukan pada beberapa jenis fitoplankton digunakan untuk mencari harga  $\Phi_F$ . Sebagai contoh harga  $\Phi_F$  pada jenis *Scenedesmus* sp. akan berupa spektrum sebagai fungsi panjang gelombang pada tingkat absorbansi sebesar  $0,1 a.u$  (Gambar 2.10). Harga tersebut diperoleh melalui eksperimen dengan sumber eksitasi lampu halogen.



Gambar 2.10. Spektrum harga  $\Phi_F$  (titik-titik c) pada *Scenedesmus* sp. akibat eksitasi dengan sumber halogen, di mana titik-titik a dan b adalah harga normalisasi absorbansi [22]